

AG

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003 年 4 月 10 日 (10.04.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/029469 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 15/53, 9/02
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/09313
- (22) 国際出願日: 2002 年 9 月 12 日 (12.09.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2001-278749 2001 年 9 月 13 日 (13.09.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人化学及血清療法研究所 (JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE) [JP/JP]; 〒860-8568 熊本県熊本市大窪一丁目 6 番 1 号 Kumamoto (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 上仲 小玲
- (KAMINAKA, Sara) [JP/JP]; 〒861-1102 熊本県菊池郡西合志町須屋 3 6 4 9 ガーデンコートみずき台 G 2 0 2 Kumamoto (JP). 上仲 一義 (KAMINAKA, Kazuyoshi) [JP/JP]; 〒861-1102 熊本県菊池郡西合志町須屋 3 6 4 9 ガーデンコートみずき台 G 2 0 2 Kumamoto (JP). 平嶋 正樹 (HIRASHIMA, Masaki) [JP/JP]; 〒861-1102 熊本県菊池郡西合志町須屋 2 6 2 9-5 Kumamoto (JP). 前田 浩明 (MAEDA, Hiroaki) [JP/JP]; 〒860-0076 熊本県熊本市壺川 1 丁目 1-1 2 栄久ハイツ Kumamoto (JP). 野崎 周英 (NOZAKI, Chikateru) [JP/JP]; 〒862-8001 熊本県熊本市武蔵ヶ丘 5 丁目 2 6-1 Kumamoto (JP). 高橋 和彦 (TAKAHASHI, Kazuhiko) [JP/JP]; 〒001-0037 北海道札幌市北区北 3 7 条西 8 丁目 2 番 3 0-4 0 9 Hokkaido (JP).
- (74) 代理人: 青山 葆, 外 (AOYAMA, Tamotsu et al.); 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 IMP ビル 青山特許事務所 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AU, CA, JP, US.

[続葉有]

(54) Title: NOVEL SELENOCYSTEIN-CONTAINING PROTEINS

(54) 発明の名称: 新規なセレノシステイン含有タンパク質

(57) Abstract: It is intended to provide novel selenocystein-containing proteins substantially serving as the essential enzymatic activity exemplified by phospholipid peroxide reducing activity. A gene comprising the coding sequence of a selenocystein-free protein having a selenocystein codon at a desired position and a selenocystein insert located in the 3' -side thereof and a protein expressed thereby which are preferably exemplified by a selenocystein-containing protein containing selenocystein transferred into albumin and having a phospholipid peroxide reducing activity and its gene. Thus, novel antioxidative substances applicable to the inhibition, prevention or treatment of worsening in the pathological conditions of various diseases in association with oxidation stress.

(57) 要約:

過酸化リン脂質還元活性で例示される酵素活性の実質的本態となる新たなセレノシステイン含有タンパク質を提供する。好適にはアルブミンにセレノシステインを導入した過酸化リン脂質還元活性をもつセレノシステイン含有タンパク質及びその遺伝子で例示される、所望の位置にセレノシステインコドンを持ったセレノシステイン非含有タンパク質のコーディング配列と、その 3' 側に位置するセレノシステイン挿入配列からなる遺伝子とその発現タンパク質からなる。酸化ストレスに関連した各種疾病に対する病態悪化阻止、予防または治療に適用されうる新たな抗酸化物質が提供される。

WO 03/029469 A1

WO 03/029469 A1



(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

明 細 書

新規なセレノシステイン含有タンパク質

技術分野

本願発明は、医療用薬剤の分野に属す新規なタンパク質に関し、詳細にはセレノシステイン非含有タンパク質にセレノシステインを導入して作られた、酵素活性を有する新規な物質に関するものである。さらに詳細には、所望の位置にセレノシステインコドンをもつセレノシステイン非含有タンパク質のコーディング配列と、その3'側に位置するセレノシステイン挿入配列（SECIS）からなる遺伝子とその発現タンパク質に関する。好適にはアルブミンにセレノシステインを導入した過酸化リン脂質還元活性を有するセレノシステイン含有タンパク質及びその遺伝子に関する。本願発明は酸化ストレスに関連した各種疾病に対する病態悪化阻止、予防または治療剤等医薬品の提供を可能ならしめるものである。

背景技術

近年、活性酸素種、フリーラジカルによる生体分子の酸化的傷害と疾患の関係が、例えば、老化、炎症、自己免疫疾患、発ガン、虚血再灌流障害、神経変性、動脈硬化、糖尿病、白内障または筋萎縮などで次々と明らかにされてきた。前記のような病態では、病因となる酸化ストレスに対抗するために様々な生体内抗酸化物質が働いている。タンパク質では、スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）やカタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ（GPx）、セルロプラスミンなど、低分子として、グルタチオン（GSH）、ビタミンEやC等が知られている。

また、アルブミンにも抗酸化作用が知られている。ヒト血清アルブミン（HSA）は、初め609残基のプレプロタンパク質として生合成され、まず、シグナルペプチダーゼによってN末端側の18残基が、さらに、続く6残基が分泌経路を経る間に切断除去され、血漿中には585個のアミノ酸残基を持った成熟型アルブミンとして存在する。アルブミンは全血漿タンパク質（7.5-8.0g/100ml）の約50-60%を占め、血漿中には生体内での全量の約40%が存在し、残りの60%は細胞外間腔に存在することから、生体内で量的に重要な抗酸化作用を担っていると考えられている。アルブミンの抗酸化能力は、酸化還元

緩衝機能が中心であると言われている。生体や細胞内は嫌気的でかなり酸素濃度の低い状態である。生命現象は、このような還元的な環境下で行われており、そのために、酸化還元状態の絶妙なバランスが必要である。例えばG S Hは分子内にS H基を1個有し、これを利用して細胞内を還元状態にしている。アルブミンも34番目（成熟型アルブミンのN末端側から数えて）のシステイン（C y s 34）がフリー（還元型）で、G S Hと同様、その圧倒的な量を利用して、生体内が酸化的な状態に傾くのを防ぎ、生体内を還元状態に保っている。

最近、アルブミンには過酸化リン脂質を還元する酵素活性があることが判明し、その活性中心がC y s 34であることが示された（R. HURSTら、Biochem. J., 338, 723 (1999)）。正常な成人男子の場合、アルブミンの約75%がフリーC y s 34を持っているが、この割合は、加齢とともに変化し、老人になるほどフリーC y s 34が減少することが知られている。このバランスは、ある種の疾患では、例えば、慢性の肝臓病や腎不全では還元型のアルブミンが大きく減少していることが認められている。また、酸化ストレス疾患の一種である敗血症患者中のアルブミンでは還元型が健常人に比べて減っており、それに伴って過酸化リン脂質還元活性も低下していることが示されている。このように、生体の恒常性や酸化ストレス疾患でのアルブミンの重要性が認められている。

発明の開示

（発明が解決しようとする技術的課題）

しかし、還元型S H基はアルブミン1分子につき1個であるので、臨床効果を上げるためには大量のアルブミン投与が必要となる。アルブミン製剤の大量投与には倫理的にも生理的にも限界があり、また大量投与にともなう副作用が知られている。例えば、アルブミン濃度4 g / d l以上の投与では、生体のアルブミン合成能が抑制され、免疫抑制をも惹起することがある。また、高濃度や大量の輸注では血圧低下や心不全など心臓への負担が増大する。このような、副作用を防ぐためには、抗酸化能力を高めたアルブミンが必要とされ、アルブミンの機能改変が望まれている。しかし、現実には、そのような機能改変したアルブミンは一切知られていなかった。

なお、本明細書の記述は、「抗酸化物質の全て」吉川敏一編、先端医学社；

「臨床アルブミン学」渡邊明治編、メディカルビュー社；「マルチ機能タンパク質：血清アルブミン」恵良聖一著、共立出版；「All about Albumin」T. Peters, JR、ACADEMIC PRESS；「医学大辞典」CD-ROM版、南山堂；「最新医学大辞典」CD-ROM第2版、医歯薬出版、の記述を参考にした。

5 (その解決方法)

上述の状況の下、本願発明者等は、新たな抗酸化ストレス剤、とりわけ過酸化脂質の関わる疾患に対する治療薬を供するべく鋭意研究した結果、ヒトアルブミンのCys 34の代わりに、Cysのイオウ(S)がセレン(Se)に置き換わったアミノ酸であるセレノシステイン（以下、「Sec」という）を導入することに成功し、その改変アルブミンに、従来報告されていなかった高活性の過酸化リン脂質還元活性を見出した。このように、Sec非含有タンパク質にSecを導入することで新たな抗酸化活性を持った物質を作ることができることを見出し、この知見に基づいて本願発明を完成するに至った。

図面の簡単な説明

15 図1はヒトセレノプロテインP cDNAの挿入されたプラスミドのマップを表す図である。なお、図1において●はポリA付加シグナルを表す。

図2は改変アルブミン遺伝子の構築工程を表す模式図である。

図3は改変アルブミン遺伝子の構築工程を表す模式図である。

20 図4は発現された改変アルブミンのウエスタンブロットを示す写真である。なお、図中の(A)および(B)において各レーンは以下のとおりである。(A)レーン1：C34C、レーン2：C34U、レーン3：intact CHO、レーン4：化血研HSA、レーン5：BSA、(B)レーン6：C34C、レーン7：C34U、レーン8：intact CHO、レーン9：化血研HSA、レーン10：BSA。

25 図5は改変アルブミン(C34U)発現細胞の培養上清を抗HSA抗体カラムに通液した際の溶出パターンを示す図である。

図6は調製された各改変アルブミンのSDS-PAGEの泳動パターンを示す写真である。なお、図6において★は溶出画分を表す。

図7は改変アルブミンの過酸化リン脂質還元活性の経時変化を示す図であり、上段のグラフはPCOOH量の経時変化を、下段のグラフはPCOH量の経時変

化をそれぞれ表す。

発明を実施するための最良の形態

本願発明の酵素活性を有する新たなタンパク質は、S e c 非含有タンパク質を基本骨格とし、当該タンパク質の1以上のC y s がS e c に置換されるかあるいは1以上のS e c の挿入または置換によって形成され、且つ酵素活性を有することを特徴とする組換えS e c 含有タンパク質であり、好適には当該酵素活性は過酸化リン脂質還元活性であり、基本骨格となるS e c 非含有タンパク質はアルブミンである。さらに、本願発明においては前記組換えS e c 含有タンパク質をコードする遺伝子及び当該遺伝子を利用した組換えS e c 含有タンパク質の調製方法をも提供する。

本発明者らは、C y s 3 4 の機能を高めるために、C y s 3 4 のSをS e に変化させることを考案した。S e は、周期率表で酸素(O)、Sと同族元素でそれらの下に位置し、S e の性質はSと原子径の大きさ以外極めて類似した性質を持ち、明確な差は認められない。しかし、C y s のSをS e に置き換えたS e c のセレノールは求核反応により過酸化物を還元できるが、その還元力はSをもつC y s よりもはるかに強いとされている。また、S e c の場合、セレノールのp K a は5.24であるのに対し、C y s のチオールは8.25である。すなわち、生体内環境である中性付近では、C y s のチオールはほとんど解離していないが、S e c のセレノールはほとんどイオン化している。本発明者らは、このようなS e とSの性質の差に着目して、アルブミンの抗酸化機能を強化することが可能であると考えた。

C y s のSをS e に変換する方法として、大きく3つの方法が考えられる。1番目の方法は、生体や細胞、あるいは無細胞などの蛋白合成系を利用する方法である。前述のようにS e とSは非常に類似した物理的性質を持っているため、過剰の無機S e 存在下では、アミノ酸の生合成システムが無差別的にSの代わりにS e を取り込んでしまうことがある。すなわち、無機S e 等として過剰なS e 源を生体に直接投与するか、動物細胞や酵母などの真核細胞の細胞培養系に混合させると、ある一定の確率で、C y s のSの代わりにS e を取り込みS e c が作られる。しかし、この方法ではSを持っているメチオニンなどもセレノメチオニン

になるなど、取り込みをコントロールすることが難しい。

2 番目の方法は、化学的な反応によって S e c を導入する方法である。この方法はセリンをターゲットに、このアミノ酸を S e c に化学的修飾で変換する方法である。具体的には、目的のタンパク質を、PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride) 処理後、H₂Se (もしくは、NaHSe と H₂O₂) 処理することで、セリンを S e c に変換することができる (Z. P. Wu および D. Hilvert, 111, 4513 (1989))。この方法を用いて、GSH 結合抗体の軽鎖のセリンを S e c に変換したり (G. M. Luo ら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 198, 1240 (1994))、セレリンプロテアーゼであるスプチリシンの活性中心である 221 番目のセリンを S e c に変換して (Z. P. Wu および D. Hilvert, 112, 5647 (1990))、ともに過酸化還元活性のある酵素を作出している。しかし、この方法は、セリンしかターゲットにすることができず、また、部位特異的に修飾を加えることが難しい。

3 番目の方法は、遺伝子組換え技術を利用する方法である。S e c は終止コードン UGA でコードされており、ユニークな機構によって翻訳される (J. F. Atkins および R. F. Gesteland, Nature, 407, 463 (2000))。セレノプロテインの mRNA の 3' 非翻訳領域 (3' UTR) には、ステムループ構造を取りうるセレノシステイン挿入配列 (SECIS) と呼ばれる配列が存在している。SECIS を削除すると翻訳が終止することから、この配列の存在がコードン UGA を終止ではなくセレノシステイン挿入として認識させるのに必須であることが知られている (M. J. Berry ら Nature vol. 353, p. 273 (1991); M. J. Berry ら EMBO J. vol. 12, p. 3315 (1993))。真核生物の UGA 翻訳機構には最低 3 つの因子が関わっていると考えられる。すなわち UGA のアンチコードンを持つ S e c - tRNA (B. J. Lee ら J. Biol. Chem. 264, 9724 (1989))、この tRNA に特異的に結合する伸長因子 (eEF S e c) (D. Fagegaltier ら EMBO J. 19, 4796 (2000)) および SECIS に結合するタンパク質 (SBP2) (P. R. Copeland ら EMBO J. 19, 306 (2000)) である。AUG から翻訳が開始し、ポリペプチドが UGA まで合成されると、SECIS-SBP2 複合体と結合している eEF S e c から S e c - tRNA が供給される。ポリペプチド鎖に S e c が結合し、S e

c挿入後も翻訳は継続し、UGA以外の終止コドンで翻訳が終止する。すなわち、3番目の方法は、このようなSec含有タンパク質の生合成メカニズムを利用する方法である。これら3つの方法はいずれも、Sec導入方法として使用できるが、最後の方法が、前者2つの方法と比べ、確実に、しかも位置特異的にSecを導入することができるので、最も好適な方法として挙げられる。

本発明者らは、前述の3番目の原理方法を利用し、抗酸化活性を持ち所望の位置にSecを有するタンパク質を作出する方法として、Sec非含有タンパク質のコーディング配列遺伝子の所望の位置にSecのコドンTGAを挿入し、そのコーディング配列の3'側にSECIS配列を持つ遺伝子を構築し、これを動物細胞で発現させる方法を考案した。さらに詳細には、基本骨格となるタンパク質は、GSHなどのチオール供与体を介して、過酸化物を還元する活性を少しでも持つSec非含有タンパク質なら、どのようなタンパク質、たとえ人工的に作られたアブザイムのような酵素活性をもつ抗体でも、その対象となりうる。

アルブミンがその好適な材料として挙げられる。そのようなタンパク質の中でSecを導入する位置は、コドンとアミノ酸配列のフレームが一致する位置ならばどの位置でもよく、その数にも左右されない。望ましくは、活性中心となっているCysやセリンなどのアミノ酸がよく、アルブミンの場合には34番目のCysが最適である。そのような望ましい配列を持ったSec含有成熟型アルブミンのアミノ酸配列として配列番号9の配列を例示することができる。SECIS配列の導入位置はアミノ酸コーディング配列の3'側ならどの位置でもよく、SECIS配列も、セレノプロテイン類の遺伝子由来ならどのSECIS配列でも使用可能である。また、その数にも限定はなく、組合せも自由であるが、セレノプロテインPの3'非翻訳領域を使用するのが望ましい。

発現調節領域となるプロモーターやエンハンサー、さらにはポリA付加シグナルなど遺伝子発現に必要なエレメントには特別な限定はなく、動物細胞用ならいかなるエレメントも使用可能である。そのようにしてデザイン、構築された遺伝子は、リポフェクチン法やエレクトロポレーションなど一般的な方法で、動物細胞に導入することができ、導入すべき動物細胞にも限定はない。しかし、そのような導入細胞の培養条件として、亜セレン酸や他のセレノプロテイン類などSec

源となるサプリメントが必要である。

以上述べてきた方法によって、新たな機能タンパク質として、Secを持った新規なタンパク質を作ることが可能である。これらの方法で作られたSec含有タンパク質は、抗酸化活性をもつ新規なタンパク質であり、特にアルブミンを基本骨格にしたものはチオール供与体存在下で過酸化リン脂質還元活性をもつ新規タンパク質である。

産業上の利用の可能性

本願発明の新規タンパク質は、活性酸素種、フリーラジカルによる生体分子の酸化伤的傷害いわゆる酸化ストレスの関わる疾患全般に治療及び予防薬として利用可能である。とりわけ、老化、炎症、発ガン、自己免疫疾患、虚血再灌流障害、神経変性、動脈硬化などの病態に対する好適な治療薬として提供される。例えば、心筋梗塞、脳梗塞や臓器移植など再灌流障害が観察される疾病、AIDS、神経変性症（パーキンソン病、アルツハイマー病、脊髄小脳変性症など）など細胞死や酸化ストレスの関わる疾患、喘息、リウマチなどの免疫疾患、敗血症など炎症性疾患などが挙げられる。また、Secを含有していることから、セレン要求性の高い組織器官（脳神経、心臓、筋肉、免疫系、生殖）に関する疾患にも適応可能である。さらに、従来のアルブミン製剤の対象としていた、出血性や外傷性のショック、侵襲の大きな手術、肝硬変、ネフローゼなどに対しても適応可能である。

以下に、実施例を挙げて本願発明をさらに具体的に説明する。なお、以下に示す実施例では、特に断りのない限り、和光純薬、宝酒造、東洋紡およびNew England BioLabs社、ファルマシア社、バイオラド社、シグマ社、ギブコBRL社製の試薬を使用した。

実施例 1

(改変アルブミン遺伝子の構築)

(1) セレノプロテインP(SeP) 3' 非翻訳領域を含有するベクター

ヒトSeP cDNAの5' 末端に 制限酵素XhoI、HindIII 認識配列を、3' 末端に BamHI、BglIII 認識配列、マウスセレノプロテインP poly A付加シグナルを付加するために、ヒトSeP cDNAが挿入されたプラスミドSeP/pBluescript（北海道大

学薬学部高橋和彦助教授より供与)を鋳型に下記配列をプライマーとして PCR を実施した(図1)。

PS1: 5' CCGCTCGAGAAGCTTGGCACGAGGCAGGCCCGTTGGAAGTGGTTGTGACAAC (配列番号1)

5 PS2: 5' GGAAGATCTGGATCCGCGGCCGCTGAGCATGCTGAACAATAAAGACACACACTTGAAAGGTTTTAAATTGCATTTTTATTGAATTTATTTGGACAAATCCGTAC (配列番号2)

サーマルサイクラーにはアステック program temp control system PC-800を、DNA ポリメラーゼには LATAq (TAKARA社)を用い、試薬濃度はキット添付プロトコールに従い、温度条件 96℃ 20 秒、68℃ 3 分の 25 サイクル、68℃ 5 分の 1 サイクルで PCR した。得られた約 2 kbp の増幅断片を TOPO TAcloning kit(Invitrogen社)の手法に従い pCR2.1 vector にクローニングした。得られたクローンについて、M13 reverse および T7 をプライマーとして、挿入断片の 5' 末端から約 200 bp の PvuII 認識配列までと、3' 末端から約 100 bp の BsmI 認識配列までの DNA 配列を解析した。解析結果から正しい配列が付加されたDNAクローンを選択し、XhoI/BglIIで消化し、得られた約 2.1 kbp の断片を pSP72 ベクターに組み込んだ(p201:図2)。SeP/pBluescript の PvuII/BsmI 消化により得られる 2 つの内部断片のうち、3' 側のPvuII-BsmI断片(0.9 kbp)を p201の PvuII/BsmI 消化後のベクター側を含む断片に挿入した(p203:図2)。

(2) c-myc付加ヒト血漿アルブミン(HSA)発現ベクター:C34Cの構築

20 HSA cDNAは、Hepatocyte mRNA (サワデーテクノロジー社)より一本鎖cDNA合成キット(ファルマシア社)を用いて調製したcDNAを鋳型として、以下の配列をもつプライマーで、前述の条件でPCRを行った。

AlbF: 5' CCTCGAGAAAAGAGATGCACACAAGAGTGAGGTTG (配列番号3)

AlbR: 5' CCGAATTCGTTATAAGCCTAAGGCAGCTTG (配列番号4)

25 このPCR断片をXhoI/EcoRIで消化し、pBluscriptIIのXhoI/EcoRIサイトにクローニングし(pALB:図3)、全長をシーケンスしてフレームシフト等のエラーのないことを確認した。

初めに、pALB内のXbaIサイトを、XbaI消化、T4ポリメラーゼによる平滑末端化、セルフライゲーションにより、欠失させた。次に、HSA cDNAの5' 末端にXhoI、

HindIII 認識配列および HSA のシグナル配列を、3' 末端に フラグとして c-myc 遺伝子の一部、SeP 遺伝子の 3' 末端非翻訳配列の一部、XbaI、BamHI、および EcoRI 認識配列を付加するため、pALB を鋳型として下記プライマーを用いて PCR を行った (図 3)。PCR 条件は LA Taq を用い、96°C 20 秒、68°C 2 分を 30 サイクル、その他は前述の場合と同様に実施した。

PH1: 5' CCGCTCGAGAAGCTTGGCACAATGAAGTGGGTAACCTTTATTTCCCTTCTTTTCTTTAGCTC
GGCTTATTCAGGGGTGTGTTTCGTCGAGATGCACACAAGAGTGAGGTTGCT (配列番号 5)

PH3: 5' CGGAATTCGGATCCTCTAGACTAAATTGGGGAGTATGTCCTATTTTAAATATTTAATTCAGATCC
TCTTCTGAGATGAGTTTTTGTCTAAGCCTAAGGCAGCTTGACTTGCAGC (配列番号 6)

10 得られた約 1.8 kbp の増幅断片を pCR2.1 vector にクローニングし、シーケンス解析により 5' 末端 ATG から PvuII サイトまでと、3' 末端から SacI サイトまでについて正しい配列を有するクローンを選択した。このクローンを XhoI/EcoRI で消化し、pSP72 に挿入した。このプラスミドの PvuII/SacI 消化断片を PCR 前の鋳型 pALB の PvuII/SacI と入れ替えた (p110)。

15 p203 と p110 を HindIII/XbaI で消化し、p203 より得られた約 3.5 kbp のフラグメントに p110 より得られた約 1.9 kbp フラグメントを挿入した (p111)。この p111 内の PvuII/SacI 断片と pALB の PvuII/SacI 断片を入れ替えた後、そのプラスミドを HindIII/BamHI で消化し、得られた約 2.9 kbp の c-myc 付加 HSA 断片を pCAG mcs (特願平 8-165249 (再公表公報 WO 97/46583)) の
20 HindIII/BamHI サイトに挿入し (p113)、これを C34C 発現ベクターとした。

(3) c-myc 付加 34 番 Cys の Ser 及び Sec 変換 HSA 発現ベクター: C34S 及び C34U の構築

25 HSA cDNA 5' 末端に制限酵素 XhoI、HindIII 認識配列および HSA のシグナル配列を付加し、ATG から約 110 bp 下流の Cys34 をコードするコドン TGT を Ser をコードするコドン TCA、あるいは Sec をコードするコドン TGA に変換するため、pALB を鋳型として、PH1 プライマーと下記プライマーを用いて PCR を行った (図 3)。PCR の条件は前述の場合と同様である。

PH4 (C34S): 5' CACAATTTTCAGCTGACTCATCAGCAACACATGTTTTTGCAAATTCAGTTACTTCATTC
ACTAATTTTACATGATCTTCAAATGGTGACTGCTGAAGATAC (配列番号 7)

PH5 (C34U): 5' CACAATTTTCAGCTGACTCATCAGCAACACATGTTTTTGCAAATTCAGTTACTTCATTC
ACTAATTTTACATGATCTTCAAATGGTCACTGCTGAAGATAC (配列番号 8)

- 得られた約 200bp の増幅断片を pCR 2.1 ベクターにクローニングし、シーケ
エンス解析によって正しい配列を有するクローンを選択した。これらを制限酵素
5 BstPI/PvuII で消化し、得られた断片を p110 の BstPI/PvuII 消化断片と入れ
替えた。得られたクローンをそれぞれ p120 (C34S)、p130 (C34U) とした。p203、
p120 および p130 を HindIII/XbaI でそれぞれ消化し、p203 より得られた約 3.5
kbp のフラグメントに p120、p130 より得られた約 1.9 kbp フラグメントをそ
れぞれ挿入した (p121、p131)。p121、p131 内の PvuII/SacI 断片と pALB の
10 PvuII/SacI 断片を入れ替えた後、そのプラスミドの HindIII/BamHI 消化断片約
2.9kbp を pCAG mcs の HindIII/BamHI サイトに挿入した (p123、p133)。これをそ
れぞれ C34S および C34U 発現ベクターとした。なお、p133 の HindIII -
BamHI 挿入断片の DNA 塩基配列を配列番号 11 に、その翻訳産物であるア
ミノ酸配列を配列番号 10 にそれぞれ示す。

15 実施例 2

(改変アルブミン遺伝子の発現)

(1) 発現ベクターの細胞への導入

- 導入 DNA は以下のようにして調製した。構築した発現ベクター C34C、C34S、
C34U で大腸菌 JM109 (TOYOBO 社) を形質転換し、250 ml LB 培地 (1% tryptone,
20 0.5% yeast extract, 1% NaCl) 中 37°C で一晩振盪培養し、アルカリ SDS 法によ
りプラスミドを精製した。得られた プラスミド DNA 溶液 より 20 μ g を採取し、
PvuI でベクター上の一カ所を消化切断、アガロース電気泳動により完全消化を
確認した後、フェノール (phenol:CHCl₃:isoamylalcohol=25:24:1) 処理およびエ
タノール沈殿によりタンパク除去、核酸抽出し、脱パイロジェンの 蒸留水 に溶
25 解した。2 μ g に相当する断片を細胞 1 well (2x10⁵個) のトランスフェクション
に使用した。

導入細胞は以下の手順で準備した。CHO 細胞 (Chinese Hamster Ovary 細胞; 大
日本製薬社) をシャーレ上で 600ng/ml SeP 断片 (特願平 10-347863
(再公表公報 WO 00/31131))、10% FBS (Fetal Bovine Serum、ハイク

ローン社)含有RPMI1640 (シグマ社) により増殖させた。トリプシンを作用させて細胞を剥離、懸濁し、細胞数を計算後、 1.0×10^5 cells/ml 同培地の細胞液を調製した。培養用 6 well テストプレート(Φ35mm) に 2 ml/well で播種した。37℃、5%CO₂ 条件下で一晩培養した。

- 5 CHO細胞への遺伝子導入には、トランスフェクション用リポフェクチン溶液 Trans-IT LT1(mirus 社)を使用した。4 ml ポリスチレンチューブ中、無血清培地 Opti-MEM(GIBCO BRL 社) 200 μ l と LT1 10 μ l をゆるやかに混和して室温に5 分間放置した。次に導入する DNA 断片 2 μ g に相当する溶液を添加し、ゆるやかに混和して室温に 5 分間放置した(DNA/リポフェクチン複合体)。
- 10 プレートに播いた細胞の培養上清を吸引除去し、新しく同じ培地に交換した。DNA/リポフェクチン複合体溶液を全量 1 well の細胞に添加した。ゆるやかに混ぜ、6 時間から8 時間 37 °C、5%CO₂ 存在下で培養した。培養上清を新しい同培地と交換した。

(2) 安定形質転換細胞の獲得

- 15 3日間同条件で培養後、0.4 mg/ml G418 (G I B C O B R L社)、10% FBS、600ng/ml SeP断片含有RPMI1640 に培地交換した。3日間毎日同培地に培地交換し、その後8日間培地を換えずに培養した。6 well プレーートの 1 well に細胞が密にシートした後、トリプシン処理により細胞を剥離し、液体窒素に保管した。

(3) 発現産物の調製

- 20 各安定形質転換細胞を 15cm培養シャーレに10%FBS, 600ng/ml SeP断片含有RPMI1640 に懸濁して播き込んだ。培養後、PBS で洗浄し、600ng/ml SeP断片含有ASFに培地交換した。親株以外は 0.4mg/ml G418を添加しておいた。3日間培養後上清 160 mlを回収し、0.22 μ m フィルターで細胞を除いた。分子サイズ10000カットの限外濾過膜(アミコン社)でC34Cは138.5倍、C34S は80倍、C34Uは131倍に濃縮した。これを以下に述べるアッセイのサンプルとした。
- 25

コントロールの培養上清としては、10% FBS, 600ng/ml SeP 断片含有RPMI1640 を培地として親株を同様にまき、600ng/ml SeP 断片含有ASF を無血清培地として同様に培養上清を得、最終的に130倍に濃縮した。

(4) 免疫沈降-ウェスタンブロット

サンプルNo. 1: C34C導入細胞培養上清濃縮液(138.5倍)、No. 2: C34U導入細胞培養上清濃縮液(131倍)、No. 3: 親株 CHO の培養上清濃縮液(130倍)、No. 4: HSA、No. 5: BSA をそれぞれ抗HSAアフィニティーセファロース (BETHYL社)を用いて次の要領で免疫沈降した。

- 5 サンプルそれぞれを 1.5 ml 試験管中で、Tween-20 終濃度 0.01% において抗HSA アフィニティーセファロース 20 μ l と混和し、室温で1時間反応させた。その後 6000 rpm で5 分間遠心し、沈殿したゲルを PBS で洗浄後、さらに 0.1%Tween含有PBSで洗浄した。遠心後の沈殿に 2xSDS sample buffer(還元剤不含)を 20 μ l 添加、混和して 100℃で 5分間熱処理した。遠心後、上清を等量
- 10 ずつ2本のチューブに分け、ウェスタンブロットのサンプルとした。

- SDS-PAGE 用 12.5% アクリルアミドゲルを作製し、2枚に免疫沈降したサンプルNo.1~5 と分子量マーカー(Rainbow markers; Amersham 社)を同じパターンで泳動した。泳動後のゲルを Western blot に使用した。プロットティング装置 (ATT0社)を使用し、添付のプロトコールにしたがって PVDF 膜にトランスファー
- 15 した(それぞれをA、Bとする)。4% スキムミルク (DIFCO社)にPVDF を浸し、37℃で30分振盪した。一次抗体として Aは抗 c-myc 抗体のビオチンラベルを終濃度各 1 μ g/ml になるように、もう一枚のBは抗HSA 抗体 HRP (Horse Radish Peroxidase)ラベルを終濃度 0.2 μ g/ml になるように 0.05% Tween, 4%スキム
- 20 ミルク含有PBS に溶解し、PVDF をこれに浸し、37℃で1時間反応させた。0.05%Tween含有PBS (PBST) で洗浄後、Aは4%スキムミルク に浸して室温で5分振盪した。つぎにアビジンHRP標識試薬として、0.4% スキムミルク含有PBST 中に VECSTATIN (VECTOR社PK-6100) の溶液を添付のプロトコールに従って調製し、PVDF をこれに浸し、37℃で30分反応させた。PBST で洗浄後、A、BともにECL
- 25 Plus (Amersham社)を用いて添付のプロトコールに従い化学発光をさせた。X線フィルム(コニカ社)に感光させ、現像液、定着液(ともにコニカ社)に順次浸して現像した。

その結果を図4に示す。Aの レーン 1 および 2 ではC34C および C34U 導入細胞の培養上清が抗 c-myc 抗体と反応しており、レーン 3 の親株の培養上清とレーン 4 の HSAおよびレーン 5のウシ血清アルブミン (BSA) は全く反応し

なかった。一方Bの レーン 6、7、9 では C34C および C34U 導入細胞の培養上清が抗 HSA 抗体と反応しており、レーン 8 の親株の培養上清およびレーン 10 のウシ血清アルブミンは全く反応しなかった。C34U導入細胞の培養上清に検出されたバンドの大きさから、34番目の S e c では翻訳が止まらず、34番目に S e c が挿入されていると考えられた。

(5) ELISA による検出

C34C、C34U、C34S を導入したCHO細胞の培養上清中のアルブミン含量を測定した。各濃縮液についてHSA 定量キット(Human Albumin ELISA quantitation Kit; BETHYL社) を利用し、添付のプロトコールに従って HSA としての量を測定した。その結果、表 1 に示すように、C34C、C34U、C34Sのいずれもがアルブミンとして検出できることがわかった。

表 1 : 改変アルブミンの発現量

サンプル	C34C	C34S	C34U	NC	C34Uクローン
濃縮倍率	138.5	80	131	1	1
濃度 (ng/ml)	61000	30300	1900	0	~37

実施例 3

(改変アルブミンの調製)

各改変アルブミン発現CHO細胞を 10%FBS含有RPMI1640 で培養、拡張し、15cm シャーレ 31枚に 1.0×10^5 cells/cm² でまき、翌日 PBS で細胞表面を洗浄後、1%FBS含有ASF を 30ml ずつ加え、5日間37℃(5%CO₂)に培養した。培養上清を回収し、培地で 1 リットルにメスアップ後、0.45 μm フィルターで濾過した。これをカラムへのアプライ源とした。抗HSA Sepharose を1ml 用意し、カラム (直径 1.5 cm)に充填後、PBS で平衡化した。平衡化は PBS、溶出は 0.1M glycine, 0.1M NaCl, pH2.8 を使用した。溶出時、コレクション用の試験管にフラクション 1 ml に対し 120 μl の 1M Tris pH8.0 を入れておいた。すべて 0.45 μmフィルター濾過した。1リットルのタンパク溶液を抗HSAカラムに 1.0 ml/min の流速でアプライし、アプライ終了後、25 ml PBS で洗浄した。その後 溶出バッファーを同じ速度で流し、1 ml/フラクションで集めた。吸光度 A280

を測定し、ピークの周囲 5 ml をプールして (図 5)、Centricon10 (MW 10,000 cut、ミリポア社) で 300 μ l まで濃縮した。各濃縮サンプルの SDS-PAGE の泳動パターンを図 6 に示す。なお、タンパク質の染色は銀染色 (関東化学社) にて行った。

5 実施例 4

(改変アルブミンの Se 含量)

C34U の改変アルブミンが Se を含んでいるかどうかを調べるために、原子吸光法による Se 定量を行った。原子吸光測定機器としてパーキンエルマ ; A Analyst 600 を使用した。Se 標準液としてナカライテスク (株) セレン標準液 1000 ppm を使い、希釈液 (0.04% デオキシコール酸ナトリウム, 0.01% Triton X-100 溶液) により希釈して検量線を作製した。C34U については、アルブミンとして 15 μ g/ml 濃度のタンパク溶液を、原子吸光測定用希釈液により 2 倍希釈したものを用いた。C34C については、アルブミンとして 15 μ g/ml 濃度では検出限界以下であったので、1.8 mg/ml 濃度のタンパク溶液を C34U と同様に希釈して検体とした。C34S については、アルブミンとして 1.5 mg/ml 濃度のタンパク溶液を同様に希釈して検体とした。各サンプルの測定結果を表 2 に示す。その結果、C34U は予想通りに、アルブミン 1 分子当たり 1 個の Se を含有していることが示された。

表 2 : 各サンプルの Se 含量

サンプル	アルブミン濃度 (μ g/ml)	volume (ml)	セレン濃度 (μ g/L)	セレン含量 (個/アルブミン1分子)
C34U	14.7	0.3	15.38	0.9143
C34C	1850	0.3	0.8	0.0004
C34S	1500	0.2	0.32	0.0002

20 実施例 5

(改変アルブミンの過酸化リン脂質還元活性)

(1) 基質

phosphatidylcholine hydroperoxide (PCOOH) : L- α -phosphatidylcholine, β -linoleoyl- γ -palmitoil (PLPC, シグマ社) 100 mg を 5 mM deoxycholate Na (ナカライテスク社) を含む 0.2 M Tris-HCl (pH 8.8) 500 ml に溶解し、soybean

lipoxydase (Biozyme laboratories社) を添加して30分間反応させた。反応後、酢酸エチルで抽出し、減圧乾固した後にMeOHに再懸濁した。これをカラムにTSKgel ODS-80Ts (φ 8.0×250 mm, TOSOH社) を、移動相にMeOH/H₂O (93:7) を用いたHPLCにより精製した。精製したPCOOHの濃度は、cumene hydroperoxide (ナカライテスク社) を標準品としてヨードメトリー法によって決定した。

(2) 反応溶液の調製

0.5 mM EDTA 3Na (ナカライテスク社)、10 mM NaN₃ (ナカライテスク社)、0.025% (v/v) Triton X-100 (和光社)、0.3 mM deoxycholate Na、2 mM glutathione (GSH、ナカライテスク社) を含む0.1 M Tris-HCl (pH7.4) の反応溶液を調製し、下に示した濃度になるようにサンプルを添加した。37℃で10 分間反応後、基質として60 nmol/mlとなるようにPCOOHを加えて反応を開始した。

サンプル濃度 : C34U	3.68 μg/ml
C34S	188 μg/ml
C34C	463 μg/ml
HSA (日本赤十字社)	4000 μg/ml

(3) HPLC用サンプルの調製

各時間 (0, 2, 4, 8, 24時間) 反応後、反応溶液から30 μlを回収し、2-propanol 270 μlに懸濁した。その後、10000 rpm、4℃で15分間遠心し、得られた上清をHPLC添加サンプルとした。

(4) HPLCによるPCOOH定量

カラムはTSKgel ODS-80Ts (φ 4.6×250 mm, TOSOH社) を、移動相は10 mM coline chloride (和光社) を含むCH₃CN/MeOH/H₂O (75:21:4) を用い、流速1.5 ml/minで行った。(3) で得られたHPLC添加サンプル50 μlをHPLCカラムに添加した。PCOOHとその還元体であるPCOHの検出は、共役ジエンの吸収極大である234 nmの吸収を測定して行った。標品として精製したPCOOHと、これをテトラヒドロ

(5) 結果

PCOOH量の経時変化と還元体であるPCOHの経時変化を図7に示す。いずれのサ

サンプルを用いた場合にも、反応時間に依存したPCOOHの減少、PCOHの増加が見られた。各時間におけるPCOOH減少量とPCOH増加量はほぼ一致していることから、PCOOHは還元されてPCOHになっていると考えられる。

- 5 各サンプルを加えた場合のPCOH増加量からコントロールであるGSHのみを添加した場合のPCOH増加量を差し引き、各サンプルに対し、近似曲線を引き、その傾きから、単位時間あたりのPCOOH還元量 (nmol/hr/ml) を算出した (表3)。その値から各サンプルの比活性を求めた。結果を表3に示す。C34Uの比活性は8.4 nmol/min/mgであった。この値はコントロールであるC34C (0.070 nmol/min/mg) の約120倍、HSA (0.017 nmol/min/mg) の約500倍であった。

10 表3：各サンプルの過酸化リン脂質還元活性比較サンプル

サンプル	アルブミン濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	PCOOH還元量 (nmol/hr/ml)	比活性 (nmol/min/mg)	活性比較	
				C34Cと 比較	HSAと 比較
C34U	3.68	1.86	8.42	120.4	495.3
C34S	188	1.40	0.12	1.7	7.1
C34C	463	1.92	0.070	1	4.1
HSA	4000	4.09	0.017	0.2	1

(従来技術より有効な効果)

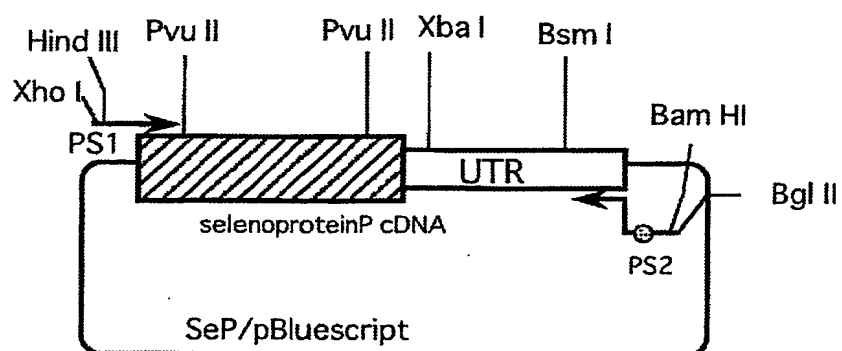
- 15 本願発明により得られた新規タンパク質は、活性酸素種、フリーラジカルによる生体分子の酸化的傷害いわゆる酸化ストレスの関わる疾患、とりわけ、老化、炎症、発ガン、自己免疫疾患、虚血再灌流障害、神経変性、動脈硬化などの病態に対する好適な治療および予防薬として提供される。

請求の範囲

1. セレノシステイン非含有タンパク質を基本骨格とし、当該タンパク質の1以上のシステインがセレノシステインに置換されるかあるいは1以上のセレノシステインの挿入または置換によって形成され、且つ酵素活性を有することを特徴とする組換えセレノシステイン含有タンパク質。
2. 酵素活性が過酸化リン脂質還元活性である請求項1記載の組換えセレノシステイン含有タンパク質。
3. 基本骨格となるセレノシステイン非含有タンパク質がアルブミンである、請求項1もしくは請求項2記載の組換えセレノシステイン含有タンパク質。
4. 配列番号9に記載のアミノ酸配列または該配列のうち1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチド鎖よりなる、請求項1から請求項3のいずれかに記載のセレノシステイン含有タンパク質。
5. セレノシステイン非含有タンパク質を基本骨格とし、当該タンパク質の1以上のシステインがセレノシステインに置換されるかあるいは1以上のセレノシステインの挿入または置換によって形成され、且つ酵素活性を有することを特徴とする組換えセレノシステイン含有タンパク質をコードする遺伝子。
6. セレノシステイン非含有タンパク質遺伝子のアミノ酸コーディング配列の所望の位置にセレノシステインのコドンを含、3'側の非翻訳領域にセレノシステイン挿入配列（SECIS配列）を含、請求項5記載の遺伝子。
7. SECIS配列がセレノプロテインP遺伝子より選択される請求項6記載の遺伝子。
8. セレノシステイン非含有タンパク質遺伝子がアルブミン遺伝子である請求項5から請求項7のいずれかに記載の遺伝子。
9. 請求項5から請求項8のいずれかに記載の遺伝子を使用して調製される請求項1記載の組換えセレノシステイン含有タンパク質。
10. 請求項5から請求項8のいずれかに記載の遺伝子を使用する請求項1記載の組換えセレノシステイン含有タンパク質の調製方法。

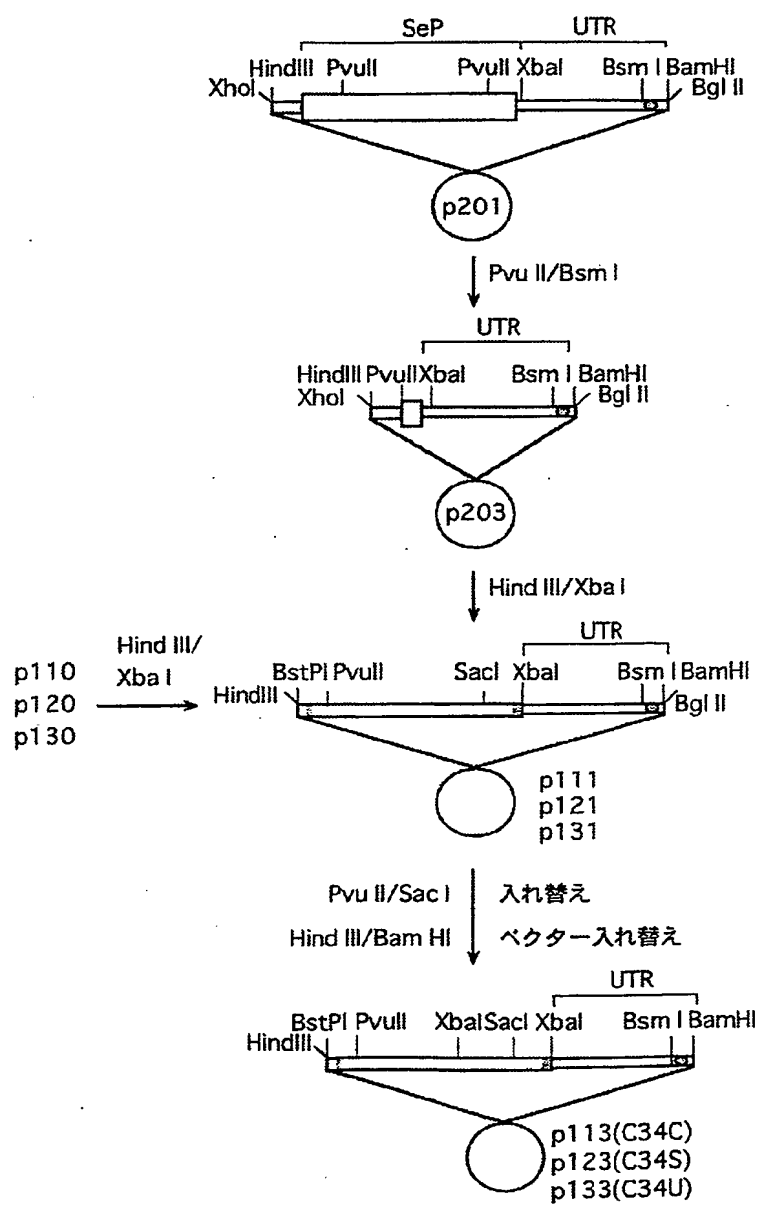
1/7

図 1



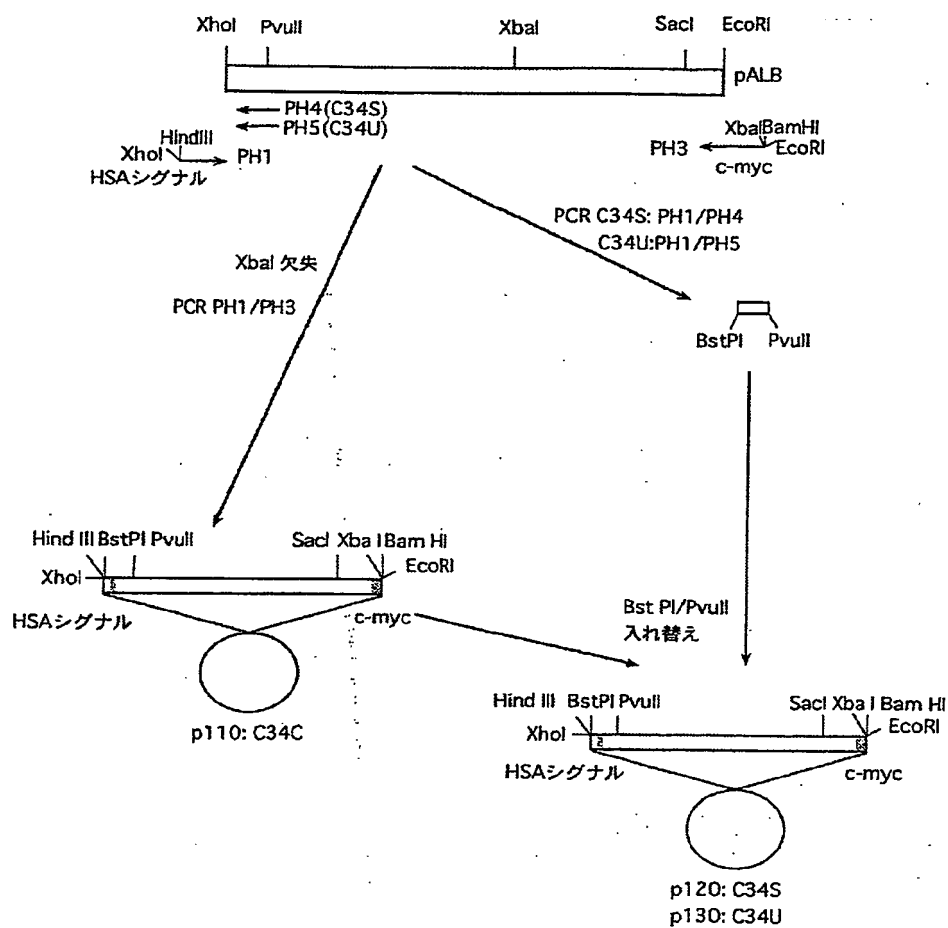
2/7

図 2



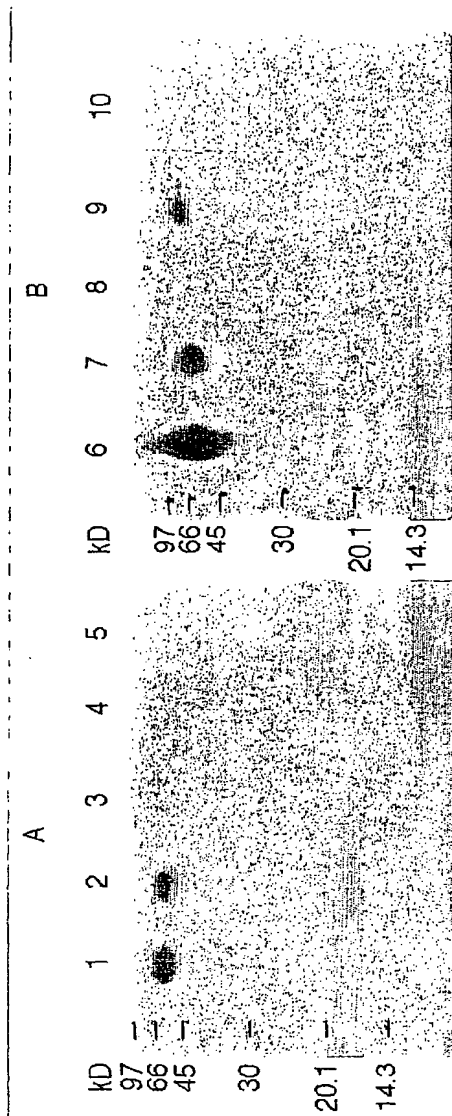
3/7

図 3



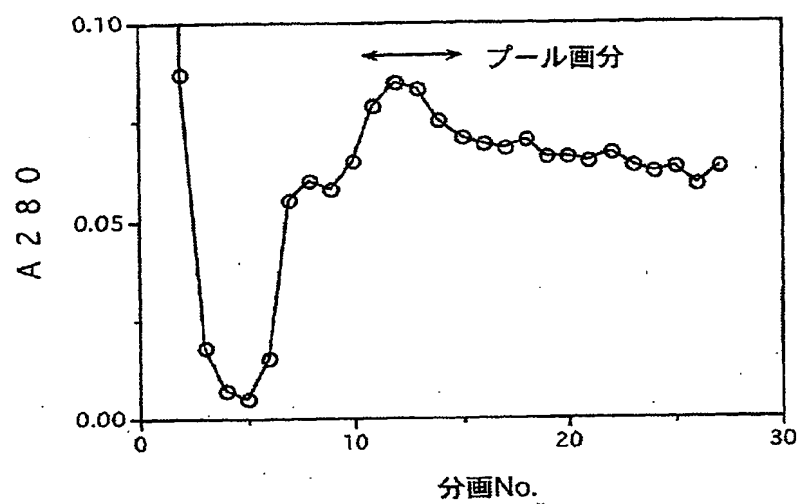
4/7

图 4



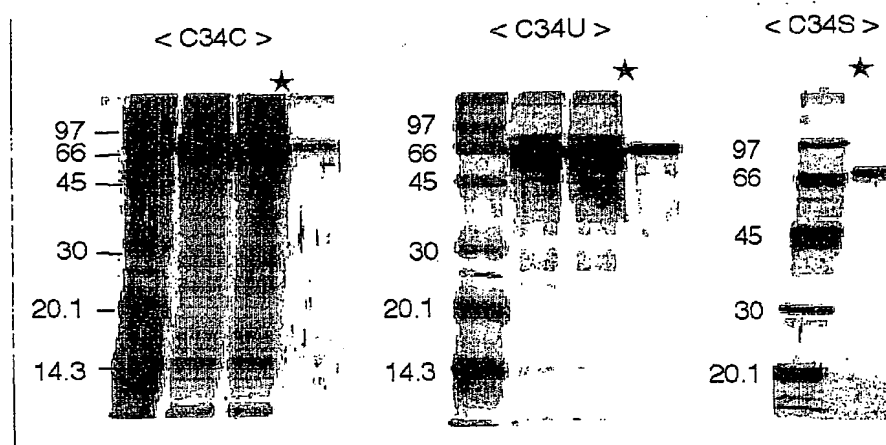
5/7

図 5



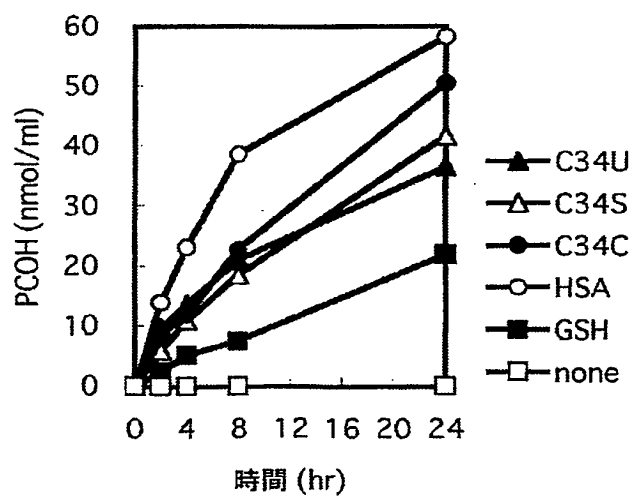
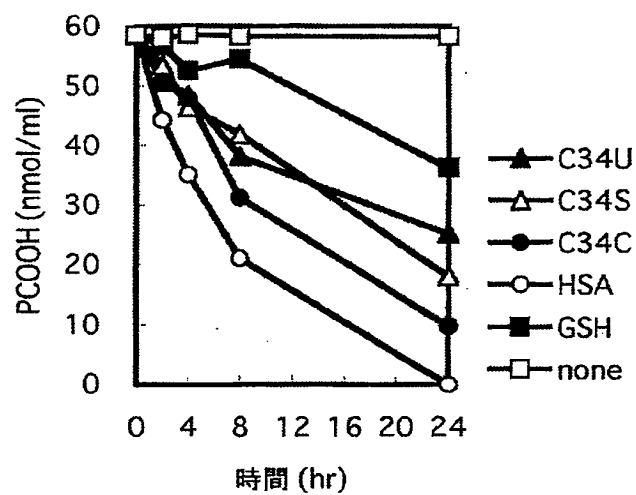
6/7

図 6



7/7

図 7



1/13

SEQUENCE LISTING

<110> JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE

<120> Novel protein containing serenocystein

<130> 663387

<150> JP 2001-278749

<151> 2001-09-13

<160> 11

<210> 1

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer, PS1

<400> 1

ccgctcgaga agcttggcac gaggcaggcc cggttggaagt ggttgtagaca ac

52

<210> 2

<211> 105

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

2/13

<220>

<223> Primer, PS2

<400> 2

ggaagatctg gatccgcggc cgctgagcat gctgaacaat aaagacacac acttgaaagg 60

ttttaaaatt gcatttttat tgaatttatt tggacaaatc cgtac 105

<210> 3

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer, AlbF

<400> 3

cctcgagaaa agagatgcac acaagagtga ggttg 35

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer, AlbR

<400> 4

3/13

ccgaattcgt tataagccta aggcagcttg

30

<210> 5

<211> 117

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer, PH1

<400> 5

ccgctcgaga agcttggcac aatgaagtgg gtaaccttta tttccttct ttttctcttt 60

agctcggctt attccagggg tgtgtttcgt cgagatgcac acaagagtga ggttgct 117

<210> 6

<211> 115

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer, PH3

<400> 6

cggaattcgg atcctctaga ctaaattggg gagtatgtcc tattttaaat atttaattca 60

gacctcttc tgagatgagt tttgtttcta agcctaaggc agcttgactt gcagc 115

4/13

<210> 7

<211> 101

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer, PH4 (C34S)

<400> 7

```
cacaattttc agctgactca tcagcaacac atgtttttgc aaattcagtt acttcattca    60
ctaattttac atgatcttca aatgggtgact gctgaagata c                        101
```

<210> 8

<211> 101

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer, PH5 (C34U)

<400> 8

```
cacaattttc agctgactca tcagcaacac atgtttttgc aaattcagtt acttcattca    60
ctaattttac atgatcttca aatgggtcact gctgaagata c                        101
```

<210> 9

<211> 585

<212> PRT

5/13

<213> Human

<220>

<223> Albumin with Cys to selenocystein mutation at 34 position

<223> Xaa represents selenocysteine

<400> 9

Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly
1				5					10				15	
Glu	Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr
				20					25				30	
Leu	Gln	Gln	Xaa	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val	Lys	Leu	Val	Asn	Glu
				35					40				45	
Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu
				50					55				60	
Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys	Leu	Cys
				65					70				75	
Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Cys
				80					85				90	
Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His
				95					100				105	
Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val
				110					115				120	
Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu
				125					130				135	
Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr
				140					145				150	
Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe
				155					160				165	

6/13

Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro		
170	175	180
Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys		
185	190	195
Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala		
200	205	210
Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys		
215	220	225
Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys		
230	235	240
Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp		
245	250	255
Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser		
260	265	270
Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu		
275	280	285
Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala		
290	295	300
Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val		
305	310	315
Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe		
320	325	330
Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu		
335	340	345
Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys		
350	355	360
Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp		
365	370	375
Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln		

7/13

380	385	390
Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn		
395	400	405
Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr		
410	415	420
Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser		
425	430	435
Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu		
440	445	450
Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu		
455	460	465
Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser		
470	475	480
Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu		
485	490	495
Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His		
500	505	510
Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys		
515	520	525
Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr		
530	535	540
Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val		
545	550	555
Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu		
560	565	570
Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu		
575	580	585

8/13

<210> 10

<211> 620

<212> PRT

<213> Human

<220>

<223> HindIII-BamHI insertion sequence in C34U expression vector

<223> Xaa represents selenocysteine

<400> 10

Met	Lys	Trp	Val	Thr	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Phe	Ser	Ser
1				5					10					15
Ala	Tyr	Ser	Arg	Gly	Val	Phe	Arg	Arg	Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu
				20					25					30
Val	Ala	His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	Glu	Asn	Phe	Lys	Ala
				35					40					45
Leu	Val	Leu	Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Xaa	Pro	Phe
				50					55					60
Glu	Asp	His	Val	Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys
				65					70					75
Thr	Cys	Val	Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu
				80					85					90
His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg
				95					100					105
Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro
				110					115					120
Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn
				125					130					135
Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala

9/13

140	145	150
Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu		
155	160	165
Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe		
170	175	180
Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala		
185	190	195
Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg		
200	205	210
Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala		
215	220	225
Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val		
230	235	240
Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val		
245	250	255
Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys		
260	265	270
His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala		
275	280	285
Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys		
290	295	300
Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala		
305	310	315
Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala		
320	325	330
Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu		
335	340	345
Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg		
350	355	360

10/13

Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys			
	365	370	375
Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro			
	380	385	390
His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val			
	395	400	405
Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu			
	410	415	420
Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr			
	425	430	435
Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val			
	440	445	450
Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro			
	455	460	465
Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val			
	470	475	480
Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp			
	485	490	495
Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro			
	500	505	510
Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu			
	515	520	525
Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu			
	530	535	540
Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu			
	545	550	555
Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala			
	560	565	570
Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala			

11/13

575	580	585
Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val		
590	595	600
Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Glu Gln Lys Leu Ile Ser		
605	610	615
Glu Glu Asp Leu Asn		
620		

<210> 11

<211> 2769

<212> DNA

<213> Human

<220>

<223> HindIII-BamHI insertion sequence in C34U expression vector

<400> 11

```

aagcttggca caatgaagtg ggtaaccttt atttcccttc tttttctctt tagctcggct      60
tattccaggg gtgtgtttcg tcgagatgca cacaagagtg aggttgctca tcggtttaaa      120
gatttgggag aagaaaattt caaagccttg gtgttgattg cctttgctca gtatcttcag      180
cagtgaccat ttgaagatca tgtaaaatta gtgaatgaag taactgaatt tgcaaaaaca      240
tgtgttgctg atgagtcagc tgaaaattgt gacaaatcac ttcataccct ttttgagac      300
aaattatgca cagttgcaac tcttcgtgaa acctatggcg aaatggctga ctgctgtgca      360
aaacaagaac ctgagagaaa tgaatgcttc ttgcaacaca aagatgacaa cccaacctc      420
ccccgattgg tgagaccaga ggttgatgtg atgtgcactg cttttcatga caatgaagag      480
acatttttga aaaaatactt atatgaaatt gccagaagac atccttactt ttatgccccg      540
gaactccttt tctttgctaa aaggtataaa gctgcttita cagaatgttg ccaagctgct      600
gataaagctg cctgcctgtt gccaaagctc gatgaacttc gggatgaagg gaaggcttcg      660

```

12/13

tctgccaaac agagactcaa gtgtgccagt ctccaaaaat ttggagaaag agctttcaaa 720
gcatgggcag tagctcgct gagccagaga tttcccaaag ctgagtttgc agaagtttcc 780
aagtttagtga cagatcttac caaagtccac acggaatgct gccatggaga tctgcttgaa 840
tgtgctgatg acagggcgga ccttgccaag tatactctgtg aaaatcaaga ttcatctcc 900
agttaactga aggaatgctg tgaaaaacct ctgttgaaa aatccactg cattgccgaa 960
gtggaaaatg atgagatgcc tgctgacttg ccttcattag ctgctgattt tgttgaaagt 1020
aaggatgttt gcaaaaaacta tgctgaggca aaggatgtct tcctgggcat gttttgtat 1080
gaatatgcaa gaaggcatcc tgattactct gtcgtgctgc tgctgagact tgccaagaca 1140
tatgaaacca ctctagagaa gtgctgtgcc gctgcagatc ctcatgaatg ctatgccaaa 1200
gtgttcgatg aatttaaacc tcttgtggaa ggcctcaga atttaataca acaaaattgt 1260
gagctttttg agcagcttg agagtacaaa ttccagaatg cgctattagt tcgttacacc 1320
aagaaagtac cccaagtgtc aactccaact cttgtagagg tctcaagaaa cctaggaaaa 1380
gtgggcagca aatgttgtaa acatcctgaa gcaaaaagaa tgccctgtgc agaagactat 1440
ctatccgtgg tcctgaacca gttatgtgtg ttgcatgaga aaacgccagt aagtgcaga 1500
gtcaccaaat gctgcacaga atccttggtg aacaggcgac catgcttttc agctctggaa 1560
gtcgtatgaaa catacgttcc caaagagttt aatgctgaaa cattcacctt ccatgcagat 1620
atatgcacac ttctgagaa ggagagacaa atcaagaaac aaactgcact tgttgagctc 1680
gtgaaacaca agccaaggc aacaaaagag caactgaaag ctgttatgga tgatttcgca 1740
gctttttagt agaagtgtg caaggctgac gataaggaga cctgctttgc cgaggagggt 1800
aaaaaacttg ttgtgcaag tcaagctgcc ttaggcttag aacaaaaact catctcagaa 1860
gaggatctga attaaatatt taaaatagga catactcccc aatttagtct agacacaatt 1920
tcatttcag catttttata aactacaaa ttagtgaacc aaaaatagaa attagatttg 1980
tgcaaacatg gagaaatcta ctgaattgac ttccagattt taaattttat gcatagaaa 2040
tattgactca aaccatattt tttatgatgg agcaactgaa aggtgattgc agcttttgg 2100
taatagtct tttttttct tttccagtg ttctatttgc tttaatgaga atagaaacgt 2160
aaactatgac ctaggggttt tctgttgat aattagcagt ttagaatgga ggaagaacaa 2220
caaagacatg ctttcattt ttctcttac ttatctctca aaacaatatt actttgtctt 2280
ttcaatcttc tacttttaac taataaata agtggatttt gtattttaag atccagaaat 2340
acttaacacg tgaatatttt gctaaaaaag catatataac tattttaaat atccatttat 2400

13/13

cttttgata tctaagactc atcctgattt ttactatcac acatgaataa aggcctttgt	2460
atctttcttt ctctaagtgt gtatcatact ctctaaaaac ttgagtggct gtcttaaaag	2520
atataagggg aaagataata ttgtctgtct ctatattgct tagtaagtat ttocatagtc	2580
aatgatggtt taataggtaa accaaacctg ataaacctga cctcctttat ggtaataact	2640
attaagcaag aatgcagtac agaattggat acagtacgga tttgtccaaa taaattcaat	2700
aaaaatgcaa ttttaaaacc tttcaagtgt gtgtctttat tgttcagcat gtcagcggc	2760
cgcggatcc	2769

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/09313

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N15/53, 9/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl.⁷ C12N15/00-15/90, 9/00-9/99

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq,
BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	HURST R. et al., Phospholipid hydroperoxide cysteine peroxidase activity of human serum albumin. Biochem. J.1999, Vol.338, pages 723 to 728	1-4, 9 3-4, 8 5-7, 10
X Y	HAZEBROUCK S. et al., Substituting Selenocysteine for Catalytic Cysteine 41 Enhances Enzymatic Activity of Plant Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase Expressed in Escherichia coli. J.Biol.Chem., 2000, vol.275, No.37, pages 28715 to 28721	1-2, 5-7, 9-10 3-4, 8
Y A	DEAGEN J.T. et al., Chemical Forms of Selenium in Selenium Containing Proteins From Human Plasma. J.Inorg.Biochem. 1991, Vol.41, No.4, pages 261 to 268	3-4, 8 1-2, 5-7, 9-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
07 October, 2002 (07.10.02)

Date of mailing of the international search report
22 October, 2002 (22.10.02)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

BEST AVAILABLE COPY

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO2/09313

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12N 15/53, 9/02		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12N 15/00-15/90, 9/00-9/99		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
MEDLINE (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq BIOSIS/WPI (DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> <u>Y</u> A	HURST R. et al. Phospholipid hydroperoxide cysteine peroxidase activity of human serum albumin. Biochem. J. 1999, Vol. 338, p. 723-728	<u>1-4, 9</u> <u>3-4, 8</u> 5-7, 10
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー		
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		
「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献		
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献		
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの		
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの		
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの		
「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	07. 10. 02	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 鈴木 恵理子
		4 N 2 9 3 7
		電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	HAZEBROUCK S. et al. Substituting Selenocysteine for Catalytic Cysteine 41 Enhances Enzymatic Activity of Plant Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase Expressed in <i>Escherichia coli</i> . J. Biol. Chem. 2000, Vol. 275, No. 37, p. 28715-28721	<u>1-2, 5-7, 9-10</u> 3-4, 8
<u>Y</u> A	DEAGEN J.T. et al. Chemical Forms of Selenium in Selenium Containing Proteins From Human Plasma. J. Inorg. Biochem. 1991, Vol. 41, No. 4, p. 261-268	<u>3-4, 8</u> 1-2, 5-7, 9-10